# Untersuchung der mitochondrialen DNA von Oenotheren bekannter genetischer Konstitution

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

AXEL BRENNICKE
aus Werne

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0007

# Untersuchung der mitochondrialen DNA von Oenotheren bekannter genetischer Konstitution

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
AXEL BRENNICKE
aus Werne

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

| | |
|---|---|
| Tag der mündlichen Prüfung | 12. Juli 1979 |
| Dekan | Prof. Dr. F. Oberwinkler |
| 1. Berichterstatter | Prof. Dr. B. Schwemmle |
| 2. Berichterstatter | Prof. Dr. A. Hager |

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Ich danke Herrn Prof. Dr. B. Schwemmle, daß er mir die Durchführung dieser Arbeiten in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat.

Herr Dr. H. Bießmann (MPI für Virusforschung, Tübingen) hat sich dafür eingesetzt, daß ich in seinem Labor verschiedene molekularbiologische Methoden lernen und anwenden konnte. Ihm danke ich herzlich für sein großes Interesse an meiner Arbeit und für viele Diskussionen, durch die er meine Überlegungen wesentlich beeinflußt hat.

Herr Prof. Dr. R.G. Herrmann (Lehrstuhl für Botanik der Universität Düsseldorf) und seine Mitarbeiter haben mir über die Schwierigkeiten der Isolierung der mt-DNA aus Pflanzen hinweggeholfen und großzügig ihre Erfahrungen in der Arbeit mit Oenotheren und Restriktionsanalyse vermittelt. Ich danke Herrn Prof. Herrmann sehr, daß er mir Aufenthalte in Düsseldorf ermöglichte und mich durch anregende Gespräche so freundlich unterstützt hat.

Frau U. Christner danke ich besonders, weil sie sich mit Sorgfalt um die Anzucht der Gewebekulturen bemüht hat, die eine wesentliche Voraussetzung für meine Arbeiten waren.

Herr Dr. W. Büsen (MPI für Virusforschung, Tübingen) hat mir freundlicherweise Ribonuklease H überlassen; Herr Prof. Dr. H. Frank stellte mir Parlodion zur Verfügung; Herr Dr. E. Jacob (MPI für Virusforschung, Tübingen) gab mir $^{32}P$ - -ATP, und Herr Prof. Dr. H. Mayer (Institut für biotechnologische Forschung, Stöckheim) war so freundlich, mir Eca I zukommen zu lassen. Ihnen allen danke ich sehr für ihre Großzügigkeit.

Herrn Dr. P. Blanz, Frau E. Deml und Frau S. Dinkelmeyer am Lehrstuhl für spezielle Botanik in Tübingen und Herrn H. Schoppmann am Tübinger Lehrstuhl für spezielle Zoologie danke ich für ihre Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. M. Steinemann (MPI für Virusforschung, Tübingen), der die Ultrazentrifugation durchführte und bei Herrn W. Wenzel (Lehrstuhl für Genetik, Tübingen) für die Aufnahme von Schmelzkurven der DNA.

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

| | |
|---|---|
| bert. | berteriana |
| Bp | Basenpaare |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| $E_{260}$ | Extinktion bei 260 nm |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| Kb | Kilobasenpaare |
| Min | Minute(n) |
| mt | mitochondrial(e) |
| Oe. | Oenothera |
| od. | odorata |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| Sek | Sekunde(n) |
| Std | Stunde(n) |

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
   1.1. Oenothera
   1.2. Mitochondriale DNA bei höheren Pflanzen
   1.3. Mitochondriale DNA aus Oenotheren

2. Material und Methoden
   2.1. Reagenzien und Pufferlösungen
   2.2. Versuchspflanzen
   2.3. Isolierung der Mitochondrien
   2.4. Isolierung der mitochondrialen DNA
   2.5. Reinigung der DNA
   2.6. Elektronenmikroskopie
   2.7. Analytische Ultrazentrifugation
   2.8. Schmelzpunktbestimmung
   2.9. Analyse mit Restriktionsenzymen
   2.10. Präparation der Plasmide pBR 322 und Col EI
   2.11. Ribonuklease H
   2.12. [$^{32}$P]-Endmarkierung der DNA

3. Ergebnisse
   3.1. Bestimmung der Schwebedichte der mt-DNA von Oenothera berteriana
   3.2. Bestimmung des Schmelzpunktes der mt-DNA von Oenothera berteriana
   3.3. Elektronenmikroskopische Darstellung der mt-DNA von Oenothera berteriana
   3.4. Restriktionsanalyse der mt-DNA aus Oenothera berteriana
   3.5. Charakterisierung der Bruchstelle der mt-DNA von Oenothera berteriana
   3.6. Verteilung von Ribonukleotiden in der mt-DNA von Oenothera berteriana
   3.7. Vergleich der mt-DNA verschiedener Oenothera-Bastarde

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literatur

## 1. Einleitung

### 1.1. Oenothera

Die einjährigen Oenothera berteriana[x] und Oenothera odorata[x] und die aus ihnen hervorgegangenen Bastarde (J.Schwemmle, 1938) haben sich auf Grund ihrer cytogenetischen Gunst als bevorzugte Versuchsobjekte für extrachromosomale genetische Untersuchungen erwiesen. Diese Oenotheren sind Komplexheterozygoten, die sich durch Selbstung als erbkonstante reine Linien gleicher genetischer Konstitution weiterziehen lassen (Hagemann, 1964; Cleland, 1972). Die beiden Komplexe B und l stammen aus der Oenothera berteriana und die Komplexe v und I aus der Oenothera odorata. Bei gleicher chromosomaler Konstitution gibt es Bastarde, die das Cytoplasma und die Plastiden der einen bzw. der anderen Elternform besitzen (B.Schwemmle, 1962).

Der Einfluß des extrachromosomalen Erbgutes bei diesen Oenotheren auf morphologische Merkmale und physiologisch-biochemische Eigenschaften ist vielfältig gezeigt: So sind z.B. Rosettenbildung und Blattform (J.Schwemmle, 1938), die photoperiodische Blühreaktion (B.Schwemmle, 1962), die Spontanperiode der circadianen Blattbewegung (Frey u.Schwemmle, 1967), die L-Phenylalanin-Ammoniumlyase-Aktivität (Hachtel u.Schwemmle, 1972), die phytochromabhängige Anthocyansynthese (Christner, 1973) und Atmungsaktivität und Membranzusammensetzung isolierter Mitochondrien (Benz, 1979) im Zusammenwirken mit dem Zellkern abhängig von den in Mitochondrien und Plastiden vererbten Informationen.

---

[x] Auf Grund der systematischen Bearbeitung der Gattung Oenothera, Sektion Oenothera (Onagraceae) von Dietrich (1977), ist die bisherige Oenothera berteriana als Oenothera villaricae und die bisher so genannte Oenothera odorata als Oenothera picensis sspec. picensis einzuordnen.

Zu diesen Ergebnissen fehlten bisher jedoch Untersuchungen an dem extrachromosomalen Erbgut selbst.

In der vorliegenden Arbeit wird deshalb die mitochondriale DNA (mt-DNA) mit dem Ziel untersucht, einerseits die methodischen Grundlagen für ihre Isolierung und Charakterisierung bei Oenotheren auszuarbeiten und andererseits die mt-DNA der beiden zur Verfügung stehenden genetischen Mitochondrientypen ("berteriana"- bzw. "odorata"-Mitochondrien) vergleichend zu untersuchen.

Eine derartige Analyse der mitochondrialen DNA könnte einen weiteren Beitrag zur Wirkungsweise des extrachromosomalen Erbgutes und seiner Konstanz bei höheren Pflanzen ergeben.

## 1.2. Mitochondriale DNA bei höheren Pflanzen

Verglichen mit tierischer mitochondrialer DNA und dem mitochondrialen Genom aus Hefe (Borst u.Grivell, 1978) ist über die mt-DNA aus höheren Pflanzen nur wenig bekannt. Der Grund dafür ist in der Heterogenität der pflanzlichen Gewebe mit Leitgefässen, verdickten Zellwänden usw. zu sehen. Dies erschwert die Isolierung ausreichender Mengen intakter Organellen; außerdem wirken oft sekundäre Inhaltsstoffe wie Gerbstoffe, phenolische Verbindungen u.ä. auf die Isolierung und Reinigung der mitochondrialen DNA hemmend. Die bisherigen Untersuchungen wurden zumeist an Keimlingen durchgeführt, die noch wenig Festigungsgewebe und Inhaltsstoffe besitzen.

Aus höheren Pflanzen wurde zum ersten Mal vor etwa 15 Jahren mt-DNA isoliert und mit Schmelzkurven und Dichtegradienten analysiert (Suyama u.Bonner, 1965).

Die Untersuchungen von Kolodner und Tewari (1973 und 1979) haben gezeigt, daß es bei Erbsen ca. 30 um lange, ringförmige Moleküle gibt. Quetier und Vedel (1977) berichten ebenfalls von 30-40 µm langen zirkulären mt-DNA Molekülen in Gurken, Tabak und Virginia Creeper. Beim Abbau dieser DNA entsteht aber eine größere Anzahl von Bruchstücken definierter Länge

als mit der im Elektronenmikroskop gemessenen Länge vereinbar ist. Die Autoren schließen daraus auf eine Heterogenität der mt-DNA höherer Pflanzen.

An Mais machen Levings und Pring (1978) die gleiche Beobachtung. Pring et al. (1978) und Levings et al. (1979) identifizieren verschiedene Größenklassen zirkulärer Moleküle in Mais und plasmidähnliche "Minicircles" in einem männlich sterilen Cytoplasma dieser Pflanze. 6 verschiedene Größenklassen können Synenki et al. (1978) im Elektronenmikroskop in der mt-DNA aus Sojabohnen unterscheiden.

Es ist noch nicht weiter untersucht, ob dieses auf eine Ähnlichkeit mit den Mini- und Maxicircles bei Trypanosomen (Borst et al., 1979) schließen läßt als Erklärung für die Diskrepanz zwischen elektronenmikroskopisch gemessener Molekülgröße und der errechneten Länge aus der Summe der Restriktionsfragmente.

Die intramolekuläre Heterogenität der Basenzusammensetzung der mt-DNA aus Pilzen erklären Fonty et al. (1975) und Terpstra et al. (1977) durch eine "genes and spacers" Modellvorstellung.

### 1.3. Mitochondriale DNA aus Oenothera

Oenotheren enthalten sehr viele Schleimstoffe (bes. Arabane, Glucane und phenolische Verbindungen), die sich kaum von den isolierten Mitochondrien abtrennen lassen. Voraussetzung zur Isolierung der mt-DNA aus Oenotheren war es also, homogene, möglichst noch undifferenzierte Zellen in genügender Menge zur Verfügung zu haben. Dies ist nur über Gewebekulturen möglich. Bisher ist es gelungen, Gewebekulturen von Oenothera berteriana selbst und Oenothera berteriana mit odorata-Mitochondrien herzustellen, außerdem von dem aus der Kreuzung (Oe.bert. X Oe.od.) hervorgegangenen Bastard mit den beiden Komplexen B und I mit bert.-Plastiden und bert.-Mitochondrien (Tab.I; zur Herkunft vgl. Schwemmle, 1962).

Ausgehend von diesen Gewebekulturen sollen in der vorliegenden Arbeit Daten zur Organisation der mt-DNA aus Oenothera berteriana dargestellt und erörtert werden; der zweite Teil zeigt die Ergebnisse einer vergleichenden Analyse der mt-DNA der oben erwähnten Bastarde.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Reagenzien und Pufferlösungen

2.1.1. Folgende Reagenzien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain

[$^{32}$P]-$\gamma$-ATP, 1mCi/mMol

New England Biolabs, Massachusetts, USA

Restriktionsenzyme Kpn I, Xba I, Ava II, Bgl I

Boehringer GmbH, Mannheim

Restriktionsenzyme BamH I, Hind III, Sma I, EcoR I
Ribonuklease A
Desoxyribonuklease
$S_1$-Nuklease
Ribonuklease $T_1$
$\lambda$-Phagen DNA
Ethidiumbromid

Worthington Biochemicals, Freehold, N.J., USA

Alkaline Phosphatase (BAPF)

Miles Labs, Lausanne, Schweiz

$T_4$-Kinase

Marine Colloids Inc., Rockland, Maine, USA

Seakem Agarose ME
Seaplaque Low Melting Agarose

Hormuth und Vetter, Wiesloch

Whatman 3MM
Whatman DE 81

Difco Labs, Detroit, USA

Bacto Agar
Nutrient Broth
Casamino Acids

Serva Feinbiochemica, Heidelberg

N-Lauroylsarkosin Na-salz (Sarkosyl)
Polyvenylpyrrolidon

Sigma, St.Louis, USA

Dithiotreitol (DTT)

Merck, Darmstadt

Proteinase K
Caesiumchlorid suprapur
Lysozym

Roth, Karlsruhe

Sephadex G-50

Außer den hier aufgeführten Chemikalien wurden analysenreine Präparate der Firma E. Merck, Darmstadt, verwendet.

2.1.2. Pufferlösungen

Extraktionspuffer

300 mM Mannit; 5 mM $MgCl_2$; 10 mM $KH_2PO_4$; 0,01 % Octanol;
4 mM Mercaptoäthanol; 5 mM EDTA; 50 mM Tris;
mit HCl auf pH 7,4 einstellen

DNase-Puffer

300 mM Mannit; 5 mM $MgCl_2$; 10 mM $KH_2PO_4$; 50 mM Tris;
mit HCl auf pH 7,5 einstellen

Lyse-Puffer

300 mM Mannit; 5 mM EDTA; 10 mM $KH_2PO_4$; 50 mM Tris;
mit HCl auf pH 7,4 einstellen

TE

1 mM EDTA; 10 mM Tris;
mit HCl auf pH 8 einstellen

1 x Tris-Ac

40 mM Tris; 20 mM Natriumacetat; 20 mM NaCl; 2 mM EDTA;
pH 8,15 mit HCOOH einstellen

RNase H-Puffer

3 mM $MnCl_2$; 30 mM Tris; 30 mM $(NH_3)_2SO_4$; 0,01 % Mercapto-
äthanol; pH 7,8 mit HCl einstellen

Stopmix

60 % Saccharose; 0,1 % SDS; 0,05 % Bromphenolblau;
100 mM EDTA

Kinase-Puffer

10 mM $MgCl_2$; 10 mM DTT; 50 mM Tris;
mit HCl auf pH 7,5 einstellen

SSC

0,15 M NaCl; 0,015 M Na-citrat

2.1.3. Medien für die Gewebekultur von Oenothera

Medium $A_o$ (nach Nitsch u.Nitsch, 1969)

Mengenangaben in mg/l aqua dest.

| | |
|---|---|
| $KNO_3$ | 950 |
| $NH_4NO_3$ | 720 |
| $MgSO_4$ | 195 |
| $CaCl_2$ | 220 |
| $KH_2PO_4$ | 68 |
| $MnSO_4$ | 11,2 |
| $H_3PO_4$ | 10 |
| $ZnSO_4$ | 10 |
| $Na_2MoO_4$ | 0,25 |
| $CuSO_4$ | 0,025 |
| FeEDTA | 40 |
| Glycin | 2 |
| Nicotinsäure | 5 |
| Pyridoxinhydrochlorid | 0,5 |
| Thiaminhydrochlorid | 0,5 |
| Biotin | 0,05 |
| Folsäure | 0,5 |
| meso-Inosit | 100 |
| Difco-Bacto-Agar | 9000 |
| Saccharose | 10000 |

Medium $A_6$

wie Medium $A_o$ zusätzlich mit

| | |
|---|---|
| Indolessigsäure (IAA) | 0,1 mg/l |
| Saccharose | 20 g/l |
| 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure | 5 mg/l |
| ϙ -Chlorphenoxyessigsäure | 1 mg/l |

2.1.4. Medien für die Anzucht von E.coli

Minimalmedium M9

| | |
|---|---|
| $Na_2HPO_4$ | 13,2 g/l |
| $KH_2PO_4$ | 3 g/l |
| NaCl | 1 g/l |
| Glucose | 4,0 g/l |
| $CaCl_2$ | 14,7 mg/l |
| $MgSO_4$ | 246 mg/l |
| Casamino acids | 4,0 g/l |
| Vitamin B1 | 16,6 µg/l |
| L-Prolin | 33,2 mg/l |
| L-Leucin | 8,4 mg/l |

## 2.2 Versuchspflanzen

Verwendet wurden Gewebekulturen von Oenothera berteriana sowie der Oenothera bert. mit od.-Mitochondrien und des Bastards B I mit bert.-Mitochondrien. Diese Gewebekulturen wurden aus Antheren angezogen.

Dazu werden die Blütenknospen oberflächensterilisiert, für 5 Min in 95%igem Äthanol, 3-5 Min in 10%igem Natriumhypochlorid und 3 x mit sterilem Aqua bidest. nachgewaschen. Die Antheren werden auf $A_o$-Medium ausgelegt,und bei 24°C in 10 Std Licht (Osram Fluora) und 14 Std Dunkelheit bilden sich nach 4-6 Wochen kleine Kalli. Diese werden auf $A_6$-Medium umgesetzt. In diesen Kulturen ist die Wachstumsgeschwindigkeit und der Habitus der Gewebe aus den verschiedenen Bastarden sehr unterschiedlich.

Tabelle 1: Genetische Konstitution der Versuchspflanzen

| Oenotherengruppe | Kern | Plastiden | Mitochondrien |
|---|---|---|---|
| 1 (Oenothera bert.) | B·1 | berteriana | berteriana |
| 2 | B·1 | berteriana | odorata |
| 8 | B·I | berteriana | berteriana |

Von den verwendeten Kulturen wächst die der Oenothera berteriana (Oenotherengruppe 1) am schnellsten und ergibt die höchste Ausbeute an mitochondrialer DNA. Deshalb wurden die methodischen Untersuchungen mit diesen Kulturen durchgeführt. Im Vergleich damit sind die Gewebekulturen der Oe.bert. mit od.-Mitochondrien (Oenotherengruppe 2) trockener und karotinoidhaltiger. Die Zellen der Gewebekulturen der B·I (Oenotherengruppe 8) enthalten unter den vorliegenden Kulturbedingungen Anthocyan und sind in ihrer Konsistenz weicher.

## 2.3 Isolierung der Mitochondrien

2.3.1. Zur Isolierung intakter und atmungsaktiver Mitochondrien wurden etwa 700 g Kallusgewebe mit kaltem Extraktionspuffer im Verhältnis 1:5 gemischt. Anschließend werden die Zellen im Braun Mixer 8 mal je 1 Sek lang zerschlagen (Abb.1).

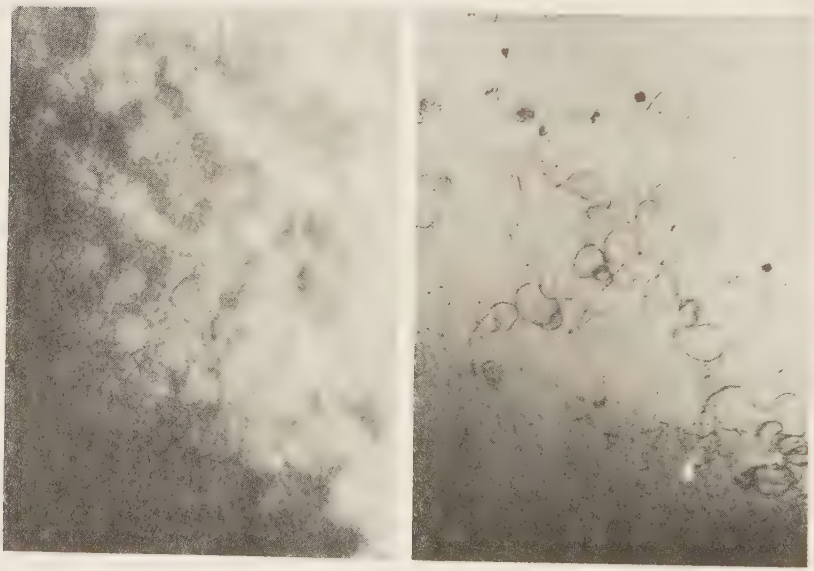


Abb.1: Aufschluß von Zellen aus der Gewebekultur von Oenothera berteriana zur Isolierung intakter Mitochondrien.
a. Intakte Zellen (240 x)
b. Aufgebrochene Zellen nach der Behandlung im "Multimix" (240 x).

Das Aufbrechen der Zellen wurde auf größte Ausbeute an atmungsaktiven Mitochondrien hin optimiert. Zellbruchstücke, Zellkerne und Proplastiden werden bei 1080 g für 15 Min in einer Sorvall Kühlzentrifuge abzentrifugiert und die Mitochondrien durch Zentrifugation für 20 Min bei 12.000 g gesammelt (Kolodner u.Tewari, 1973).

2.3.2. Die so vorgereinigten Mitochondrien werden für eine Stunde bei 4°C mit 70 µg/ml DNase I in DNase Puffer inkubiert, um an den äußeren Membranen anhaftende Kern- und Plastiden-DNA zu entfernen. Dreimaliges Waschen mit je 250 ml Extraktionspuffer verdünnt die DNase. Gleichzeitig wird das Enzym inhibiert durch EDTA-Bindung der $Mg^{2+}$-Ionen aus dem Medium. Alle diese Schritte werden in der Kälte durchgeführt.

2.3.3. Die Atmungsaktivität der Mitochondrien wurde mit einer Sauerstoffelektrode (YSI Model 53 Oxygen Monitor) als Abnahme des $O_2$-Gehaltes in der Lösung bestimmt (Benz, 1979).

## 2.4. Isolierung der mitochondrialen DNA

2.4.1. Die gewaschenen Mitochondrien werden in 5 ml Lyse-Puffer suspendiert und in einem Zentrifugenröhrchen (Beckman Ti 50) unter 0,5 mg/ml Proteinase K (vorinkubiert bei 37°C für 30 Min) mit 0,4 % Sarkosyl für 10 Min auf Eis lysiert. Durch die gleichzeitige Proteinase-Behandlung erhält man eine 20-30 % höhere Ausbeute an mt-DNA.

2.4.2. Zum schonenden Herauslösen der DNA aus den lysierten Mitochondrien wurde die Zentrifugation in ein Caesiumchloridkissen hinein angeschlossen (Herrmann, pers.Mitteilung; Whitfield et al., 1978). Festes CsCl wird bis zu einer Dichte von 1 g/ml zu den lysierten Mitochondrien zugegeben und die Suspension mit CsCl-Lyse-Puffer (Dichte $\varrho$ = 1,7) vorsichtig unterschichtet. In diesem Kissen wird die DNA bei 100.000 g für 14 Std gesammelt und vorgereinigt.

Am Ende der Zentrifugationszeit wird der gesamte Inhalt eines Zentrifugenröhrchens fraktioniert zu Fraktionen von etwa 0,7 ml. Je 1 µl jeder Fraktion werden auf einen Glasfiberfilter getropft, getrocknet und in einer EtBr-Lösung von 10 µg/ml kurz angefärbt. Im UV-Licht fluoreszieren die Proben aus den DNA enthaltenden Fraktionen. Diese werden vereinigt und gegen 3 mal 2 l TE über Nacht dialysiert.

## 2.5. Reinigung der DNA

2.5.1. Zu der DNA im Dialyseschlauch wird RNase A (10 Min bei 100° vorinkubiert) bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml gegeben und bei 37° für 1 Std inkubiert.

2.5.2. Mit Proteinase K (0,5 mg/ml) wird für 12-14 Std die DNA weitgehend von Proteinen befreit.

2.5.3. Weiter deproteinisiert wird die DNA durch zweimaliges vorsichtiges Ausschütteln mit Phenol, equilibriert mit 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,5. Phenolreste werden durch einmaliges Ausschütteln mit Chloroform/Isoamylalkohol (24/1; v/v) entfernt.

2.5.4. Ein CsCl-Gleichgewichtsgradient trennt die DNA noch weiter von Verunreinigungen mit RNA oder Proteinen. Dazu wird eine Lösung aus 8,1 g CsCl in 7 ml DNA in TE mit 300 µg/ml EtBr bei 120.000 g für 48 Std im Beckman Ti 50 Rotor zentrifugiert. Im entstehenden Gradienten (Bereich etwa min = 1,63 g/cm$^3$ und max = 1,74 g/cm$^3$) sammelt sich die DNA in der ihrer Dichte entsprechenden Zone und ist unter UV-Licht als scharf fluoreszierende Bande erkennbar.

Nach vorsichtigem Absaugen der über der Bande stehenden Lösung wird die DNA aufgenommen und das EtBr durch 4maliges Ausschütteln mit Isopropylalkohol (gesättigt mit CsCl/$H_2O$) entfernt. Dialysiert wird 3 x gegen je 2 l TE in der Kälte, um das CsCl aus der DNA-Lösung zu entfernen.

2.5.5. Die DNA-Konzentration in der Lösung wird nach der Extinktion 260/280 im Zeiss PMQ2 in TE bestimmt, wobei 20 O.D. einer Konzentration von 1mg/ml DNA entsprechen. Die DNA-Lösung wird anschließend mit 1/10 Vol 2,5 M Natriumacetatlösung versetzt und die DNA mit 2 Vol Äthanol über Nacht bei -20°C ausgefällt. Die DNA wird für 45 Min bei 12.000 g und -20°C sedimentiert, getrocknet und mit einer Konzentration von 1 mg/ml in TE aufgenommen.

## 2.6. Darstellung der DNA im Elektronenmikroskop

2.6.1. Nach Eintrocknen bildet ein 3,5 % Parlodion/3,5 % Amylacetat-Tröpfchen auf einer Wasseroberfläche einen dünnen Film, auf den 200 mesh Kupfernetzchen gelegt und mit einem Filterpapier aufgenommen werden. Nach dem Trocknen sind die befilmten Netzchen gebrauchsfertig (Royer, persönliche Mitteilung; Royer u.Hollenberg, 1977).

2.6.2. In einem Tröpfchen mit Cytochrom c (60 mg/ml), Ammoniumacetat (0,3 M pH 7,3) und DNA (etwa 0,5 mg/ml) bildet sich ein denaturierter Cytochromfilm an der Wasser/Luft-Grenze, die DNA lagert sich an das basische Protein an und kann mit dem befilmten Kupfernetzchen abgetupft werden. Man dehydriert anschließend in 50 % Äthanol und 90 % Äthanol.

2.6.3. Mit 3 cm der Legierung 1003 (Pt, Pd, Au, Ag) werden die Präparate unter einem Winkel von 8° kegelbedampft.

2.6.4. Die fertigen Netzchen werden im Zeiss M9 Elektronenmikroskop betrachtet und photographiert.

## 2.7. Analytische Ultrazentrifugation

Die Arbeiten an der analytischen MSE-Ultrazentrifuge wurden nach der Methode von Steinemann (1978) durchgeführt und nach Schildkraut et al. (1962) berechnet.

## 2.8. Schmelzpunktbestimmung

Der Schmelzpunkt ($T_m$) der mt-DNA in 1 x SSC wurde aus einer Schmelzkurve bestimmt, die mit einem Gilford-Spektralphotometer aufgezeichnet worden war. Die Berechnung des GC-Gehaltes aus dem $T_m$ erfolgte nach Marmur und Doty (1962).

## 2.9. Analyse mit Restriktionsenzymen

2.9.1. Der enzymatische Abbau mit Restriktionsenzymen wurde in Puffersystemen jeweils nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Pro µg mitochondrialer DNA wurden 3-5 units Enzym eingesetzt. Zur Kontrolle wurde die dreifache Menge an Enzym eingesetzt. Nach der Inkubationszeit von 1 Std bei 37°C wird für 10 Min bei 65°C das Enzym inaktiviert. Dadurch wird gleichzeitig die Reassoziation von Fragmenten verhindert. Zu jeder Probe werden anschließend 15 % Stopmix gegeben.

2.9.2. Zur Gelelektrophorese werden für ein 1%iges Gel 0,5 g Agarose in 45 ml $H_2O$ dest für 5-10 Min gekocht. 5 ml 10 x Tris-Ac werden hinzugegeben und die Lösung bei 60-70°C gegossen. Nach 30 Min ist das Gel erhärtet und die DNA-Proben werden in den Taschen aufgetragen. Mit 1 x Tris-Ac als Elektrodenpuffer läuft der Bromphenolblaumarker bei 40 mA in 4-5 Std durch das Gel. In 3 µg EtBr/ml Wasser wird das Gel für 15 Min durchgefärbt.

2.9.3. Polyacrylamidgele (4-6 %) wurden wie beschrieben polymerisiert (Brennicke and Frey, 1977).

2.9.4. Die gefärbten Gele werden im UV-Licht betrachtet und durch einen Rotfilter mit einer Polaroid Land Kamera dokumentiert. Die DNA-Fragmentlängen werden aus den relativen Wanderungsgeschwindigkeiten zu mitelektrophoretisierten Markern (λ/Hind III und λ/EcoR I) ermittelt.

## 2.10. Präparation der Plasmide pBR 322 und ColE I

Die beiden Plasmide im E.coli Stamm K 12 wurden freundlicherweise von Dr.H.Bießmann, MPI für Virusforschung, Tübingen, zur Verfügung gestellt. Die Plasmide wurden im Medium M9 angezogen und mit Chloramphenicol amplifiziert. Durch vorsichtige Lyse der Zellen (Guerry et al., 1973) wird das Plasmid gewonnen. Der Supercoil-Anteil wird im CsCl-Dichtegradienten gereinigt.

## 2.11. Ribonuklease H1

Ribonuklease H ist ein Enzym, das aus DNA-RNA Hybriden spezifisch die Ribonukleotide freisetzt (Büsen, 1976). Nach 10 Min Inkubation bei 37°C werden mit 1 µl der konzentrierten und gereinigten Enzympräparation aus 1 µg "supercoiled" DNA 2750 pM Ribonukleotide freigesetzt (Büsen, 1976). Als Kontrollsubstrat für die Reinheit der Enzympräparation wurden die supercoil-Plasmide pBR 322 und ColE I eingesetzt.

## 2.12. [$^{32}$P]-Endmarkierung von DNA

2.12.1. Die alkalische Phosphatase löst das 5' endständige Phosphat einer DNA ab, das dann mit zugegebenem radioaktiv markiertem ATP ersetzt werden kann. Die gekaufte Phosphatase muß vor dem Versuch frisch dialysiert werden (1 Std bei Raumtemperatur gegen 10 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0), um das in der Präparation vorhandene Ammoniumsulfat zu entfernen. In 50 mM Tris-HCl pH 8,8 werden 3 µg DNA mit 1 µl des dialysierten Enzyms für 60 Min bei 65°C inkubiert. Nach jeweils 20 und 40 Min wird 1 µl frisches Enzym zugegeben. Die Reaktion wird durch Inkubation mit 5 mM Titriplex I für 20 Min bei Raumtemperatur und 10 Min bei 65°C abgebrochen.

2.12.2. An die so vorbehandelte DNA wird nun radioaktiv markiertes Phosphat angehängt: Die DNA wird mit 4 µl $T_4$-Kinase und 5 µCi [$^{32}$P]-γ-ATP für 60 Min bei 37°C in Kinase-Puffer inkubiert.

2.12.3. Zur Entfernung des nicht eingebauten ATP wird die DNA über eine Sephadex G-50 Säule (12,5x0,5 cm) mit TE gereinigt und in Fraktionen zu je 7 Tropfen gesammelt. Mit einem Geigerzähler wird die Aktivität jeder Fraktion bestimmt. Die DNA enthaltenden Fraktionen (DNA eluiert unter diesen Bedingungen vor dem ATP) werden vereinigt und die spezifische Aktivität der markierten DNA wird nach TCA-Fällung bestimmt. Nach einer Äthanol-Fällung zur Einengung des Volumens wird die DNA in wenig TE aufgenommen.

2.12.4. Nach der Methode von Boseley et al. (1978) und Smith und Birnstiel (1976) werden die DNA-Fragmente auf einem Gel aufgetrennt und das Gel unter einem Whatman DE 81 Papier mit aufgelegtem, mehrfach gewechselten, Whatman 3 MM Chromatographiepapier getrocknet.

2.12.5. Das an dem DE 81 Papier anhaftende Gel wird nach der Trocknung zur Autoradiographie auf einen Kodak X-omatic rapid Film gelegt und mit einer Quanta Z Verstärkerfolie über Nacht oder länger bei -70°C exponiert.

## 3. Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit wurde darauf hingewiesen, daß eine wesentliche Schwierigkeit bei der Isolierung von mt-DNA aus höheren Pflanzen in der schonenden Reinigung der Makromoleküle liegt. Ein großer Teil der Arbeit war daher die Entwicklung und Optimierung der Methode zur Aufbereitung der mt-DNA. Einen entsprechenden Umfang nimmt die Beschreibung der hier ent-

wickelten Verfahren im Teil "Material und Methoden" ein.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse besprochen, die Aussagen machen zur Organisation der mt-DNA der Oenothera berteriana; daran schließt sich der Vergleich der Restriktionsfragmente der untersuchten Bastarde an.

## 3.1. Bestimmung der Schwebedichte der mt-DNA von Oenothera berteriana

In der analytischen Ultrazentrifuge bildet sich durch die Zentrifugation ein CsCl-Gradient aus und die DNA in dieser Lösung sammelt sich an der Stelle, die ihrer Dichte entspricht. Durch Messung der Absorption bei 254 nm durch den Gradienten läßt sich so die Schwebedichte einer DNA-Probe über die Dichte einer mitzentrifugierten Referenz-DNA bestimmen. Abb.2 zeigt eine solche Absorptionskurve von mt-DNA aus Oenothera berteriana mit DNA aus Pseudomonas aeruginosa als Referenz. Der Hauptanteil der aus gereinigten Mitochondrien gewonnenen DNA (etwa 80 %) findet sich bei einer Dichte von 1,71 g/cm$^3$, und etwa 15-20 % der Präparation haben eine Schwebedichte von 1,703 g/cm$^3$. Der leichtere Anteil bei 1,703 g/cm$^3$ besteht aus Kern-DNA (Herrmann et al., 1975), so daß etwa 80 % dieser Präparation aus mitochondrialer DNA bestehen. Die Dichte von 1,71 g/cm$^3$ in CsCl entspricht einem GC-Gehalt der DNA von 51 % (Schiltkraut et al., 1962).

Zur Absicherung dieser Bestimmung des GC-Gehaltes wurden noch Schmelzpunktbestimmungen durchgeführt.

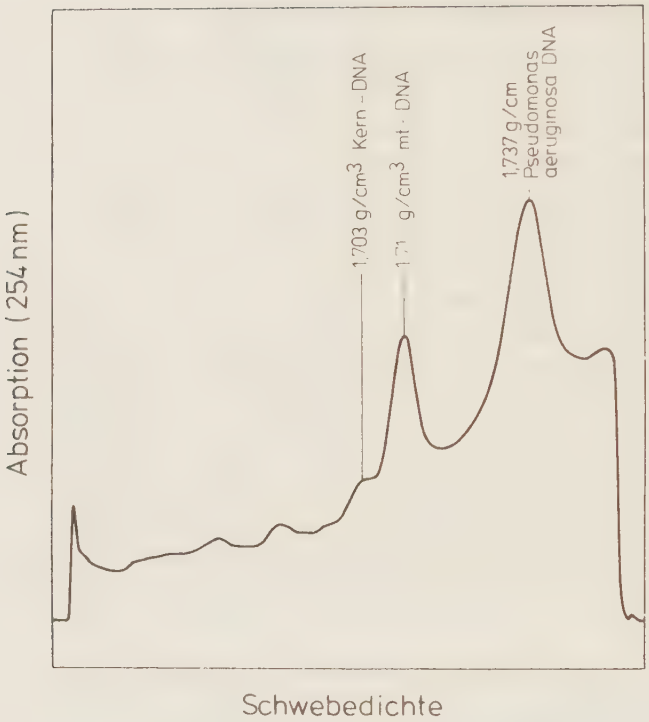



Abb.2: Bestimmung der Schwebedichte der mt-DNA aus Oenothera berteriana in der analytischen Ultrazentrifuge.

Etwa 10-20 % der gesamten DNA haben eine Dichte in CsCl von 1,703 g/cm$^3$ entsprechend der Dichte von Kern-DNA in Oenothera (Herrmann et al., 1975). Die mt-DNA hat eine Schwebedichte von 1,710 g/cm$^3$ in CsCl.

### 3.2. Bestimmung des Schmelzpunktes

Die Abb.3 zeigt drei solcher Schmelzkurven der mt-DNA aus Oenothera berteriana. Während einer langsamen Temperaturerhöhung der DNA-Lösung nimmt die Hyperchromizität der DNA zu. Der Wendepunkt einer solchen Kurve wird als Schmelzpunkt bezeichnet und ist abhängig u.a. vom GC-Gehalt der DNA. Bei der vorliegenden Ionenstärke von 1xSSC hat die mt-DNA einen Schmelzpunkt von 90°C. Daraus läßt sich auf einen GC-Gehalt dieser DNA von 50,5 % schließen (Marmur and Doty, 1962).

Die beiden GC-Bestimmungen aus der Dichte und dem Schmelzpunkt stimmen für die mt-DNA von Oenothera berteriana sehr gut miteinander überein und der GC-Gehalt dieser DNA liegt also etwa zwischen 50,5 und 51 %.

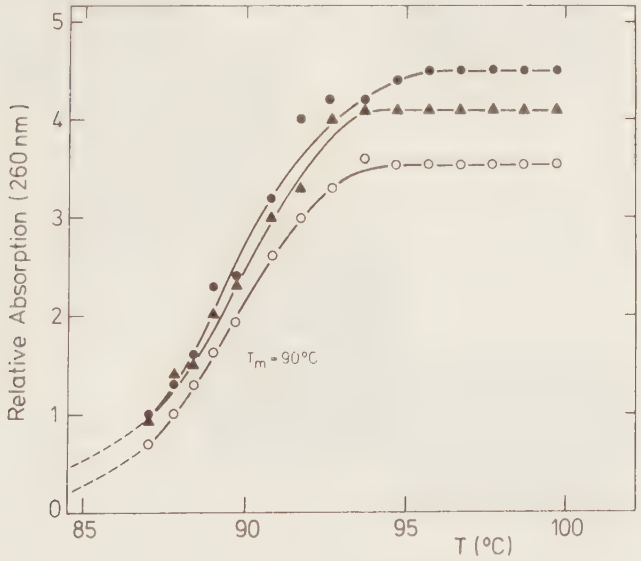



Abb.3: Schmelzkurven von mt-DNA aus Oenothera berteriana von 3 verschiedenen Präparationen. Der Schmelzpunkt von $T_m$=90°C in 1xSSC entspricht einem GC-Gehalt von 50,5 %.

### 3.3. Elektronenmikroskopische Darstellung der mt-DNA

Mit den hier beschriebenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen können zur Zusammensetzung der mt-DNA keine Aussagen gemacht werden. Eine elektronenmikroskopische Darstellung der DNA, wie in Abb.4 gezeigt, liefert Information über die Länge der Moleküle und läßt über die gefundenen einzelnen zirkulären Moleküle einen Schluß auf die in vivo Konfiguration zu. Da sich einzelne zirkuläre Moleküle darstellen lassen, ist anzunehmen, daß dies der in vivo Zustand der mt-DNA aus Oenothera berteriana ist. Zirkularität der mt-DNA wurde bei fast allen bisher untersuchten mt-DNA's nachgewiesen (Pring et al., 1977; Quetier and Vedel, 1977; Synenki et al., 1978).

Der geringe Prozentsatz intakter zirkulärer DNA ist aus der langen Isolierungs- und Reinigungsmethode zu erklären, die eben nur sehr wenige Moleküle intakt überleben. Diese ganzen Moleküle scheinen nur bei unvollständiger Behandlung mit Proteinase vorhanden zu sein und sind mit einem Protein zusammen in vielen Fällen unter dem Elektronenmikroskop darstellbar (Abb.5). Von den präparierten und ausgemessenen Molekülen ist nur eine Grösse überwiegend zu beobachten, die der größten Moleküle mit einer Länge von etwa 100 Kb. Die kürzeren DNA-Stücke (zu einem Teil auch Bruchstücke der kontaminierenden Kern-DNA) haben eine Längenverteilung ohne spezielle Präferenz für eine andere Größenklasse. Kleinere zirkuläre Moleküle, wie kürzlich bei Sojabohnen (Synenki et al., 1978) und bei Mais (Pring et al., 1977) in Präparationen mitochondrialer DNA gefunden, sind in den Mitochondrien der Oenothera berteriana nicht vorhanden. Da während der Reinigungsschritte immer eine Selektion auf kleine Molekülgrößen hin stattfindet - je größer ein Molekül, umso leichter bricht es bei mechanischer Handhabung - , sollten kleinere Molekülringe in der gereinigten DNA in relativ größerem Anteil vorhanden sein als in vivo und dürften somit einer Beobachtung nicht entgehen.

Die elektronenmikroskopischen Darstellungen der mt-DNA aus Oenothera berteriana lassen also auf eine Ringstruktur der DNA schließen mit einer einheitlichen Größe von etwa 100 Kb. Dieses DNA-Molekül ist in vivo mit einem Protein assoziiert, das durch Proteinase entfernt werden kann. Diese Ablösung des Proteins hat fast ausschließlich die Linearisierung der zirkulären Moleküle zur Folge.

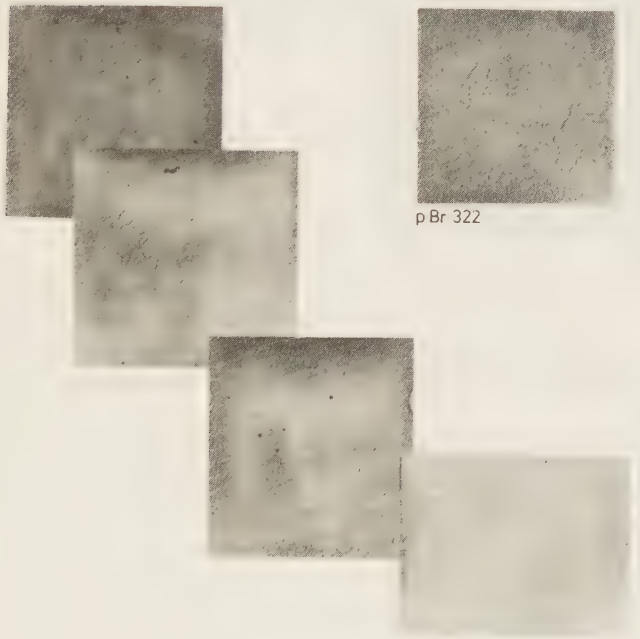



Abb.4: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines DNA-Moleküls aus Mitochondrien von Oenothera berteriana.

Zur Eichung und Längenbestimmung wurden Moleküle des Plasmids pBR 322 (3,94 Kb) nach dem gleichen Verfahren photographiert. Das wiedergegebene Molekül mt-DNA ist etwa 100 Kb lang.

Abb.4a: Elektronenmikroskopische Darstellung der mt-DNA aus Oenothera berteriana ohne Proteinase-Behandlung.

Die DNA liegt in Schleifenform, ausgehend von einem elektronenoptisch dichten Partikel.

Abb.4b: Ein einzelnes mt-DNA Molekül aus Oenothera berteriana mit anhaftenden Partikeln

## 3.4. Restriktionsanalyse der mt-DNA aus Oenothera berteriana

Die isolierte und gereinigte mt-DNA aus Oenothera berteriana wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und die so erhaltenen Bruchstücke auf einem 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb.6). Die getesteten Restriktionsenzyme schneiden die mt-DNA alle in jeweils mehr als 35 Fragmente. Lediglich das Enzym Eca I, das ein Heptanukleotid im Gegensatz zu den anderen getesteten Enzymen erkennt, die ein Hexanukleotid als Erkennungssequenz haben, zerlegt die DNA in etwa 20 Fragmente. Die Größe der Fragmente wurde aus einer Eichkurve der mitelektrophoretisierten λ-Phagen DNA-Fragmente aus Hind III- und EcoR I-Abbaureaktionen (Abb.7) bestimmt. In Tabelle 2 sind die Fragmente von mt-DNA aus

Oenothera berteriana, die durch Behandlung mit verschiedenen Restriktionsenzymen entstehen, ihrer Größe entsprechend aufgeführt. Der Unterschied der Gesamtlänge der aneinandergereihten Fragmente zwischen 180-185 Kb bei EcoR I und BamH I und 218 Kb bei Sma I kann evtl. darauf zurückzuführen sein, daß das 26 Kb Fragment aus dem Sma I Abbau kein echtes Fragment darstellt, sondern noch eine Schnittstelle für das Enzym enthält. Dieses Fragment ist nur in 50 % der Fälle nachweisbar gewesen, daher diese Überlegung. Diese Beobachtung ließe sich bei sehr oft gebrochenen DNA-Strängen durch eine zu geringe Anzahl intakter Fragmente dieser Größe erklären. Wahrscheinlicher scheint aber die erste Erklärung zu sein, nach der die interne Erkennungsstelle für Sma I nicht immer leicht zugänglich ist für das Enzym.

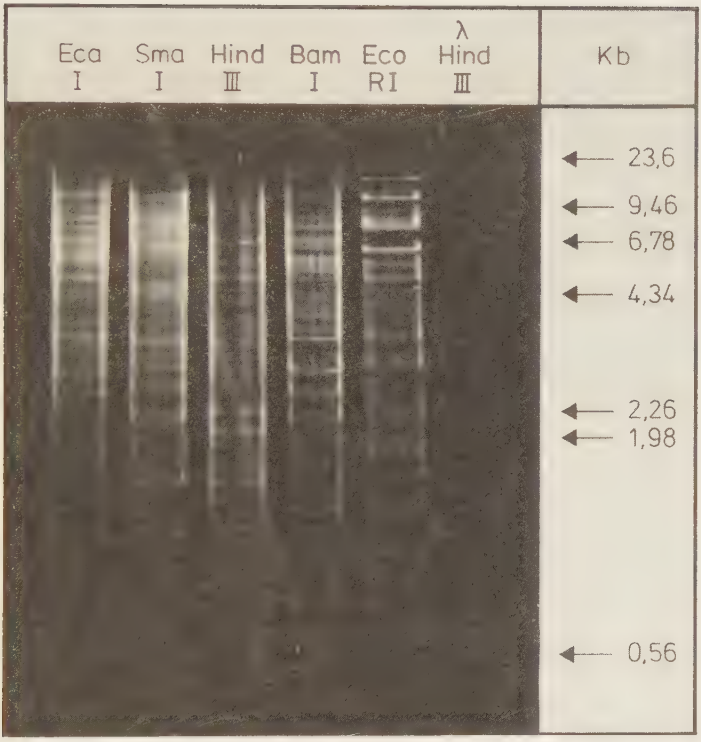



Abb.6: Gelelektrophorese der Restriktionsfragmente der mt-DNA von Oenothera berteriana.

Die Restriktionsfragmente wurden auf einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid photographisch dokumentiert. Die Hind III Fragmente des Phagen λ wurden als Größenstandards benutzt.

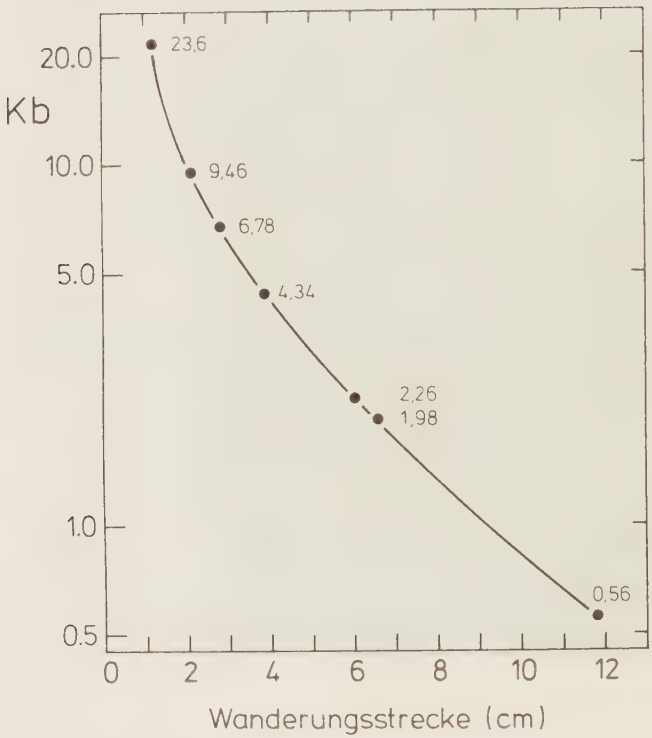



Abb.7: Eichkurve der Hind III-Fragmente des Phagen λ aus dem Gelbild der Abb.4. Aus dieser Eichung lassen sich die Fragmentgrößen der mt-DNA dieses Gels bestimmen.

Tabelle 2: Restriktionsfragmentlängen von mt-DNA aus Oenothera berteriana. - Die Fragmentlängen wurden aus 3 (für Sma I aus 4) verschiedenen DNA-Präparationen ermittelt.

| Frg.Nr. | Eco RI (Kb) | Bam HI (Kb) | Sma I (Kb) |
|---|---|---|---|
| 1 | 14.6 | 19.5 | 26.0 |
| 2 | 10.9 | 15.3 | 20.2 |
| 3 | 10.6 | 14.0 | 16.3 |
| 4 | 9.4 | 11.3 | 14.6 |
| 5 | 8.8 | 10.3 | 13.5 |
| 6 | 8.3 | 8.5 | 11.0 |
| 7 | 7.9 | 7.8 | 10.3 |
| 8 | 7.2 | 7.05 | 9.4 |
| 9 | 6.1 | 6.7 | 8.5 |
| 10 | 5.5 | 6.05 | 8.1 |
| 11 | 5.3 | 5.6 | 7.7 |
| 12 | 5.0 | 5.4 | 7.1 |
| 13 | 4.8 | 5.1 | 6.65 |
| 14 | 4.6 | 4.75 | 6.3 |
| 15 | 4.35 | 4.3 | 6.0 |
| 16 | 4.15 | 4.0 | 5.35 |
| 17 | 4.0 | 3.9 | 4.6 |
| 18 | 3.9 | 3.7 | 4.15 |
| 19 | 3.7 | 3.5 | 4.0 |
| 20 | 3.55 | 3.55 | 3.3 |
| 21 | 3.45 | 3.2 | 3.1 |
| 22 | 3.3 | 2.95 | 2.8 |
| 23 | 3.15 | 2.7 | 2.6 |
| 24 | 3.0 | 2.55 | 2.52 |
| 25 | 2.85 | 2.42 | 2.25 |
| 26 | 2.75 | 2.22 | 2.15 |
| 27 | 2.6 | 2.14 | 1.85 |
| 28 | 2.5 | 1.9 | 1.77 |
| 29 | 2.35 | 1.75 | 1.54 |
| 30 | 2.3 | 1.55 | 1.25 |
| 31 | 2.25 | 1.45 | 1.15 |
| 32 | 2.1 | 1.35 | 1.05 |
| 33 | 1.8 | 1.1 | 0.94 |
| 34 | 1.7 | 1.05 | 0.8 |
| 35 | 1.55 | 0.97 | |
| 36 | 1.45 | 0.85 | |
| 37 | 1.38 | 0.75 | |
| 38 | 1.32 | 0.7 | |
| 39 | 1.1 | 0.62 | |
| 40 | 1.02 | 0.57 | |
| 41 | 0.88 | 0.52 | |
| 42 | 0.72 | | |
| 43 | 0.65 | | |
| 44 | 0.58 | | |
| | 180.7 Kb | 183.61 Kb | 218.82 Kb |

Aus der Fragmentlängensumme errechnet sich eine Molekülgröße von 180-220 Kb, ungefähr doppelt so viel wie die im Elektronenmikroskop bestimmte Länge von 100 Kb (Brennicke, 1979a, 1979b). Mögliche Erklärungen werden im nächsten Abschnitt erörtert.

### 3.5. Charakterisierung der Bruchstelle der mt-DNA

Wie oben beschrieben, erhält man nach Ablösen aller Proteine fast nur lineare Moleküle mt-DNA aus Oenothera berteriana. Für diese Bruchstelle(n) in der DNA gibt es zwei Möglichkeiten: Die DNA kann entweder an einer beliebigen Stelle durch die mechanischen Einwirkungen abbrechen oder/und es könnte eine besonders exponierte Stelle auf dem Molekül sein, die besonders leicht unter diesen Bedingungen dissoziiert.

Um diese Frage zu klären, wurde an die freien Enden mit $T_4$-Kinase $[^{32}P]$-$\gamma$- ATP gebunden. Durch diese Markierung lassen sich Restriktionsfragmente der Molekülenden von solchen aus der Molekülmitte, die unmarkiert bleiben, unterscheiden.

Bei einer gleichmäßigen Verteilung der Bruchstellen über die ganze Länge des Moleküls ist eine gleichmäßige Markierung aller Fragmente und der Zwischenstücke zu erwarten. Liegt die Bruchstelle immer an der gleichen Stelle, so sollte nur ein Fragment markiert sein (bzw. als zweites das auf der anderen Seite an die Bruchstelle grenzende Fragment).

Wie die Abb.8 zeigt, ist die Radioaktivität nach Autoradiographie eines 1%igen Agarose-Gels der Restriktionsfragmente nicht gleichmäßig in allen Fragmenten verteilt. Die Bruchstelle liegt aber auch nicht auf wenige Nukleotide genau definiert, sondern die markierten Fragmentlängen schwanken bei EcoR I Fragmenten um ein Fragment von etwa 650 Bp und bei Eca I um das Fragment von 2000 Bp.

Die Bruchstelle der mt-DNA aus Oenothera berteriana während der Isolierung und Reinigung von Proteinen ist also nicht frei verteilt über das gesamte Molekül und nicht auf eine auf wenige Nukleotide festlegbare Stelle zu lokalisieren, sondern mehr als eine "Region" des Moleküls nach diesen Experimenten zu definieren.

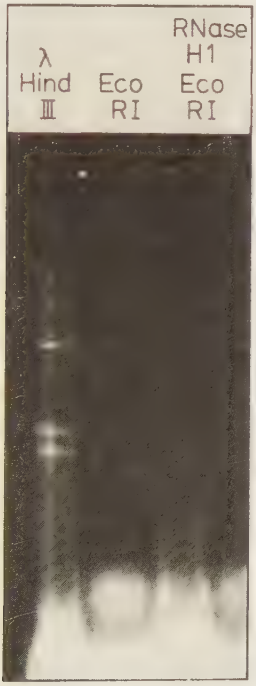



Abb.8a: Hochmolekulare [$^{32}$P]-endmarkierte mt-DNA von Oenothera berteriana nach Abbau mit Restriktionsenzym Eco RI, aufgetrennt auf einem 1%igen Agarose-Gel und autoradiographisch aufgenommen. Die markierten Fragmente von etwa 650 Bp sind nach RNase H1-Behandlung nicht mehr in dieser Größe vorhanden.

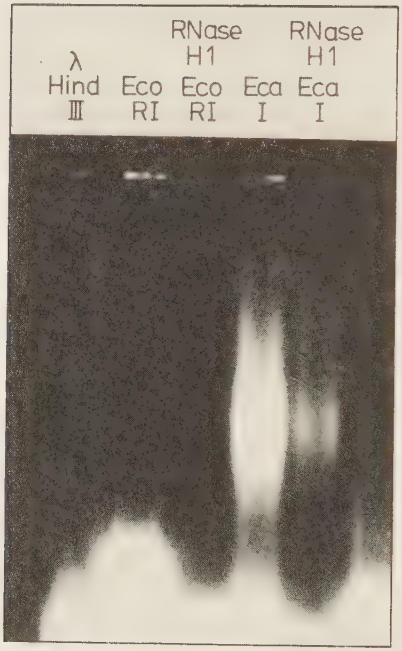



Abb.8b: Mt-DNA von Oenothera berteriana wurde wie in Abb.8a behandelt und die Restriktionsfragmente aufgetrennt. Die Spaltung der markierten mt-DNA mit dem Enzym Eca I führt zu einem markierten Fragment von etwa 2000 Bp, das durch Behandlung mit RNase H1 abgebaut wird.

## 3.6. Verteilung von Ribonukleotiden in der mt-DNA von Oenothera berteriana

Blair et al. (1972) wiesen kurze Sequenzen von Ribonukleotiden in dem Plasmid ColE 1 nach, und Clayton et al. (1979) finden Ribonukleotide in der Nähe der "origin of replication" bei mt-DNA aus Mäusen.

Das Vorhandensein und die Verteilung solcher Ribonukleotidsequenzen in der mt-DNA von Oenothera berteriana wurde mit dem Enzym Ribonuklease H1 untersucht. Dieses Enzym "erkennt" DNA-RNA-Hybride und setzt aus einem solchen Hybrid Ribonukleotide frei (Büsen, 1976). Die Spezifität der RNase H1-Präparation und ihre Reinheit von DNase wurde an "supercoiled", unter Chloramphenicol amplifizierten, Plasmiden pBR 322 getestet (Abb.9).

Mit RNase H1 behandelte mt-DNA wurde anschließend mit Restriktionsenzym geschnitten und die entstandenen Fragmente mit den Fragmenten ohne RNase H1-Behandlung verglichen. Sind die Ribonukleotide in einem Fragment lokalisiert, so sollte dieses Fragment durch RNase H1-und $S_1$-Nuklease-Behandlung geteilt werden und aus dem Fragmentmuster verschwinden. Diese Beobachtung läßt sich bei der mt-DNA von Oenothera berteriana nicht machen: Die Fragmentmuster mit und ohne RNase H1-Behandlung zeigen keinen Unterschied bei verschiedenen getesteten Restriktionsenzymen.

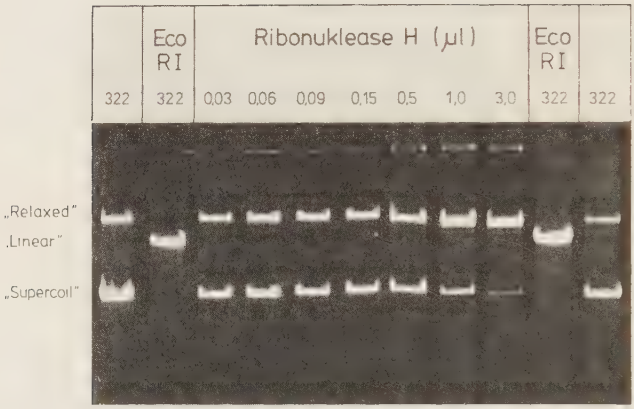



Abb.9: Überprüfung der RNase H1-Präparation auf Einzelstrang-DNase-Aktivität.

Der Anteil an "supercoiled"-DNA des Plasmids pBR 322 wird durch steigende Konzentrationen des Enzyms Rnase H1 zunehmend in die "relaxed"-Form überführt, ohne daß nachweisbare Mengen an "open circle"-DNA entstehen. Auf dem Plasmid gibt es einmal die Erkennungssequenz für das Enzym Eco RI und es entstehen nur lineare Moleküle.

Dieses Ergebnis läßt keinen eindeutigen Schluß zu auf die tatsächliche Verteilung der Ribonukleotide. Bei einer ähnlichen Verteilung, wie sie im Col E1 Plasmid (Blair et al., 1972) vorliegt, wo 50 % der Ribonukleotide in der Nähe des "origin" konzentriert sind und der Rest statistisch über das gesamte Molekül verteilt ist, kann die entsprechende Abnahme eines betroffenen Fragmentes auf dem Gel nicht eindeutig erkennbar sein. Als zweite Möglichkeit können natürlich alle enthaltenen Ribonukleotide gleichmäßig bei den verschiedenen Molekülen verteilt sein. Eine dritte mögliche Erklärung (außer einer völligen Abwesenheit von Ribonukleotiden in dieser mt-DNA) ist gegeben, wenn die Ribonukleotide am Ende eines Fragmentes sind, so daß durch RNase H1-Behandlung dieses Fragment nur um eine kleine Zahl von Ribonukleotiden verkürzt wird und seine Größe nur geringfügig verändert wird.

Da Clayton et al. (1979) eine enge räumliche Beziehung zwischen den Ribonukleotiden und dem "origin" bei Maus-mt-DNA gefunden haben und Sparks und Helinski (1979) von einer Assoziation des "origin" mit einem Membranprotein bei Col E1 berichten, liegt es nahe, die Ribonukleotide in der mt-DNA von Oenothera berteriana an der in vivo mit einem Protein assoziierten "Bruchstelle" zu suchen. Diese Bruchstelle bildet ja jeweils die Enden eines Fragmentes.

Abb.8 zeigt, daß die Endmarkierung an dieser Bruchstelle der DNA sich durch eine RNase H1-Behandlung ablösen läßt. Ein grosser Teil der in der mt-DNA von Oenothera berteriana vorhandenen Ribonukleotide befindet sich also in der unmittelbaren Umgebung des mit einem Protein assoziierten Teiles der DNA.

### 3.7. Vergleich der mt-DNA verschiedener Oenothera-Bastarde

Wie Tabelle 1 zeigt, besitzen die mit Oe-Gruppe "1" und "8" bezeichneten Bastarde Mitochondrien der Oenothera berteriana (Versuchsgruppe 1), die Oe-Gruppe "2" dagegen die Mitochondrien der Oenothera odorata.

Abb.10 zeigt den Vergleich der Restriktionsfragmente der Versuchsgruppen "1" und "2" verschiedener Restriktionsenzyme auf 1 % Agarose-Gelen aufgetrennt. Sequenzunterschiede zwischen den beiden Mitochondrientypen verschiedener Herkunft werden deutlich durch die unterschiedliche Verteilung der Restriktionsstellen auf den beiden Molekülarten.

Abb.11 zeigt als Beispiel für die Identität der mt-DNA aus den beiden Versuchsgruppen "1" und "8" den Vergleich der Restriktionsfragmente des Enzyms Sma I. Wie die Fragmente der übrigen getesteten Enzyme Eco RI, Bam H1 und Hind III läßt sich auch bei den mit dem Enzym Sma I erhaltenen Fragmenten die Identität der mitochondrialen DNA in den beiden Bastarden "1" und "8" nachweisen.

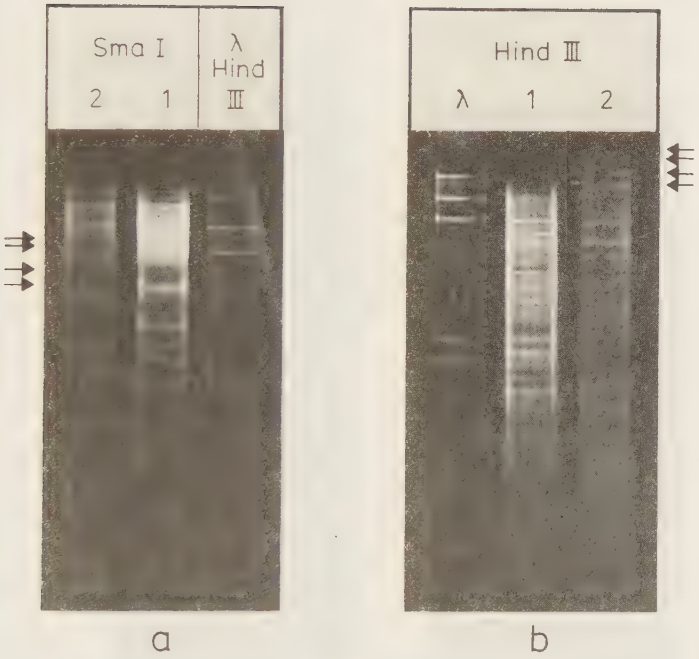
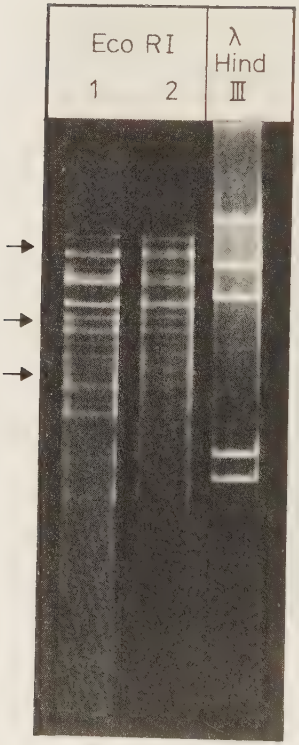
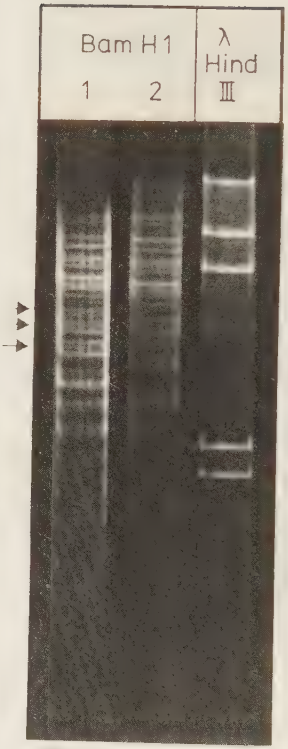



Abb.10: Vergleich der Restriktionsfragmente der mt-DNA der Oenothera berteriana mit berteriana-Mitochondrien (1) bzw. mit odorata-Mitochondrien (2). Einige der bei beiden Gruppen unterschiedlichen Fragmente sind durch Pfeile gekennzeichnet.
Behandlung mit Sma I : 10a
Behandlung mit Hind III : 10b
Behandlung mit Eco RI : 10c
Behandlung mit Bam HI : 10d

(Abb.10c und 10d auf S.36)




c




d

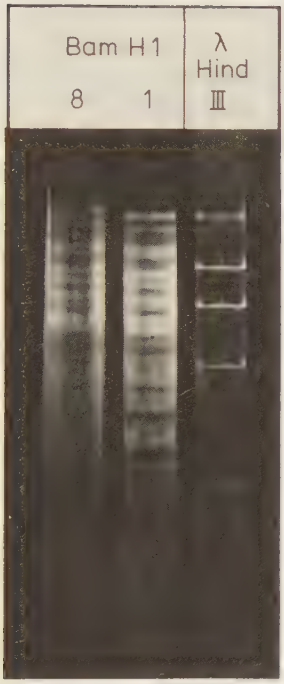



Abb.11: Vergleich der Restriktionsfragmente der Oenothera berteriana (1) und des Bastards B I (8), beide mit berteriana-Mitochondrien.

Als Beispiel sind die Bam H1-Restriktionsfragmente auf einem 1 % Agarose-Gel aufgetrennt.

## 4. Diskussion

Die aus der Mitochondrienfraktion von Oenothera berteriana isolierte DNA wurde zunächst als mitochondriale DNA identifiziert. Etwa 80 % der gereinigten DNA haben eine Schwebedichte von 1,71 g/cm$^3$ und 20 % banden bei 1,703 g/cm$^3$ im CsCl-Dichtegradienten. Herrmann et al. (1975) haben für die nukleäre DNA aus zweijährigen Oenotheren eine Dichte von 1,703 g/cm$^3$ und für die Plastiden-DNA dieser Oenotheren eine Dichte von 1,698 g/cm$^3$ bestimmt. Damit läßt sich die hier isolierte DNA als mt-DNA mit etwa 20 % Anteil an Kern-DNA identifizieren.

Die mt-DNA von Oenothera berteriana ist mit 1,71 g/cm$^3$ die schwerste mt-DNA, die bisher in höheren Pflanzen gefunden wurde. In allen anderen bisher untersuchten Spezies beträgt die Schwebedichte der mt-DNA in Caesiumchlorid 1,706 g/cm$^3$, so z.B. bei Bohnen (Wells u.Birnstiel, 1969), Kartoffeln (Vedel u.Quetier, 1974), Erbsen (Kolodner u.Tewari, 1972), Mais (Pring et al., 1977), Sojabohnen (Synenki et al., 1978) und verschiedenen anderen (Wells u.Ingle, 1970). Der sich aus der Dichte errechnete GC-Gehalt von 51 % ist in guter Übereinstimmung mit den 50,5 % GC aus der Schmelzkurve mit einem Schmelzpunkt von $T_m = 90^o$.

Eine solche Erhöhung des relativen GC-Gehaltes läßt sich sehr leicht z.B. durch eine Deletion in den nicht codierenden AT-reichen "Spacer"-Sequenzen zwischen den Genen der mt-DNA erklären. So sind die Unterschiede zwischen den mt-DNA-Molekülen verschiedener Spezies von Drosophila melanogaster ausschließlich in den Größenschwankungen einer AT-reichen Region zwischen 950 und 5150 Basenpaaren lokalisiert (Wolstenhome et al., 1979).

Die Länge der mt-DNA in Oenothera berteriana unterscheidet sich nicht wesentlich von der anderer höherer Pflanzen. Wie bei Kartoffeln und Virginia creeper (Quetier u.Vedel, 1977),

Erbsen (Kolodner u.Tewari, 1972) und den größten zirkulären Molekülen in Sojabohnen (Synenki et al., 1978) ist die Länge der mt-DNA in Oenothera berteriana ungefähr 1000 Kb. Im Gegensatz zu den neueren Befunden bei Sojabohnen (Synenki et al., 1978) und Mais (Levings u.Pring, 1979a u.1979b) sind bei Oenothera jedoch keine verschiedenen Größenklassen zu erkennen, es scheint also keine intermolekulär heterogene Population an Molekülen verschiedener Größe vorzuliegen.

Die in der Präparation vorhandenen 20 % Kern-DNA, die auch nach der DNase-Behandlung der Mitochondrien auftreten, lassen sich auch im CsCl-Gleichgewichtsgradienten wegen des geringen Unterschiedes in der Schwebedichte nicht abtrennen und sind deshalb im Elektronenmikroskop im Anteil der linearen Bruchstücke immer vorhanden.

Da bei Oenotheren-mt-DNA keine Mischpopulation aus ringförmiger DNA verschiedener Größe beobachtet wurde - kleinere Ringe sollten in diesen Präparationen, falls vorhanden, während der Extraktions- und Reinigungsprozeduren stark angereichert werden -, kann eine solche Zusammensetzung der mt-DNA nicht die Erklärung sein für die beobachtete große Zahl an Restriktionsfragmenten[1] (Brennicke, 1979a u.b). Die Summe der Fragmentlängen ist mit 2000 Kb etwa doppelt so groß wie die im Elektronenmikroskop beobachtete maximale Moleküllänge. Am wahrscheinlichsten sind als Erklärung einmal eine selektive Methylierung der mt-DNA (Quetier u.Vedel, 1977) und die Vorstellung, daß die "Spacer" zwischen den Genen variabel sind und vielleicht nach bestimmten Regeln verändert werden (Fonty et al., 1975; Terpstra et al., 1977).

---

[1] Es ist bisher noch nicht gelungen, auf sehr niederprozentigen Gelen (0,2-0,3 % Agarose) diese verschiedenen Größenklassen von Molekülen aufzutrennen und so eine Kontrolle dieser Messungen zu erhalten (Pring, pers.Mitteilung).

Eine Kartierung der Restriktionsfragmente würde z.B. sofort zeigen, ob inter- oder intramolekuläre Heterogenität vorliegt. Bei 30-40 verschiedenen Fragmenten ist dies jedoch außerordentlich zeitaufwendig.

Vereinfachen läßt sich die Kartierung z.B. durch die Markierung eines spezifischen Punktes auf der DNA. Diese Stelle kann dann in unvollständigen Abbaureaktionen direkt die Reihenfolge der Anschlußfragmente angeben (Boseley et al., 1978; Smith u.Birnstiel, 1976). Einige Versuche wurden auch durchgeführt, um die Bruchstelle der mt-DNA während der Isolierung zu untersuchen und eine evtl. vorhandene "Sollbruchstelle" für eine solche Markierungsreaktion zu benutzen. Die Markierung der nativen DNA zeigte eine bei verschiedenen Molekülen nur um wenige Nukleotide verschobene Bruchstelle in der DNA. Die Größe des Fragmentes mit der Bruchstelle schwankt um eine für jedes Restriktionsenzym andere Länge. Dies läßt sich durch die Annahme erklären, daß die DNA an einem Protein - vielleicht der Membran - assoziiert ist und bei der Reinigung in diesem Bereich abreißt. Daß diese komplexe Bindungsstelle an einem Protein liegt, wird durch die elektronenmikroskopischen Beobachtungen bestätigt (Abb.4a und 4b): Die aus den Mitochondrien in ein CsCl-Kissen zentrifugierten DNA-Moleküle sind fast immer mit diesem Protein verbunden.

Bei der mt-DNA von Oenothera berteriana scheinen also ähnliche Verhältnisse vorzuliegen wie von Sparks und Helinski (1979) in E.coli-Minizellen gefunden wurden. Dort ist die "origin/terminus"-Region des Col E1-Plasmids mit einem Protein der Zellmembran assoziiert.

Die mt-DNA in HeLa-Zellen ist mit dem "origin of replication" an einem Membranprotein assoziiert, wie Albring et al. (1977) mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Restriktionsfragmente zeigen konnten. Aus Physarum polycephalum isolierte mt-DNA-Proteinkomplexe sind im Elektronenmikroskop sehr ähnlich den

in Oenothera berteriana gefundenen Strukturen (Abb.4a und 4b).

"Supercoiled" DNA in den Chloroplasten verschiedener höherer Pflanzen ist nach elektronenmikroskopischen Beobachtungen ebenfalls mit einem Protein assoziiert (Herrmann et al., 1975). Erst durch eine Proteinase-Behandlung ist es möglich, zirkuläre DNA frei von Proteinen zu erhalten. In mt-DNA aus Mäusen gibt es am "replication origin" Ribonukleotide in verschiedenen Positionen (Clayton et al., 1979).

Um die Anheftungsstelle der mt-DNA von Oenothera zu charakterisieren, wurde untersucht, ob das Enzym RNase H die Endmarkierung an der DNA-Bruchstelle verändert. RNase H ist eine Endonuklease, die ein Hybrid aus Ribonukleotiden und Desoxyribonukleotiden zwischen den Ribonukleotiden spaltet. Der Einzelstrang aus Desoxyribonukleotiden bleibt dabei intakt, wie durch die beschriebenen Versuche mit "supercoiled" Plasmiden pBR 322 nachgewiesen wurde.

Die endmarkierten linearen mt-DNA-Moleküle wurden mit RNase H behandelt; dabei verschwindet die Endmarkierung. Das bedeutet aber, daß die Endmarkierung an Ribonukleotide enthaltenden Fragmenten gewesen sein muß, die durch die Behandlung mit RNase H dann nicht mehr in der vollen Größe auftreten. Eine mögliche Erklärung wären Verunreinigungen an Einzelstrang-Nuklease ($S_1$-Nuklease) in den DNA-Präparationen. Diese können nach RNase H-Behandlung die Fragmente, an denen sich die Markierung befindet, zerschneiden, so daß nur noch radioaktiv markierte kleine Bruchstücke bleiben, die sich nicht mehr auf einem solchen Gel nachweisen lassen.

Diese Reaktion ist aber nur unter einer Bedingung möglich: Die Ribonukleotide müßten in dem Endfragment der linearen Moleküle sein. Solche Ribonukleotidstücke (30-40 Bp) finden sich in E.coli-Plasmid Col E1 zu etwa 50-60 % in der Nähe des "origin" (Blair et al., 1972).

Es scheinen also bei der mt-DNA in Oenothera berteriana ganz ähnliche Strukturen vorzuliegen wie bei dem Plasmid Col E1: Das DNA-Molekül ist am oder in der Nähe der "origin/terminus"-Region an einem Protein befestigt.

Ob und wie dieses Protein an oder in der Membran organisiert ist, bleibt noch zu untersuchen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit werden die Cytoplasmone verschiedener Bastarde aus Oenothera berteriana und Oenothera odorata an Hand der mitochondrialen DNA verglichen. Mitochondriale DNA läßt sich im Vergleich selbst nahe verwandter Spezies unterscheiden, da die hohe Evolutionsrate dieser DNA zu häufigen Sequenzänderungen führt (Kroon et al., 1978; Upholt u.Dawid, 1977; Cummings et al., 1979).

Der als Oenotherengruppe 2 bezeichnete Bastard hat nach der Kreuzungsherkunft (B.Schwemmle, 1962) das Cytoplasmon der Oenothera odorata. Die Elternform Oenothera berteriana (Oenotherengruppe 1) und die Oenotherengruppe 8 sollten beide das Cytoplasma der Oe.berteriana vererben. Die genetische Konstitution spiegelt sich auch in den mit verschiedenen Restriktionsenzymen erhaltenen Fragmenten wieder: Die mt-DNA der Oenotherengruppe 2 läßt sich deutlich von der mt-DNA der Oe. berteriana unterscheiden. Diese Charakterisierung der mt-DNA über Nukleotidsequenzverschiebungen macht erst eine eindeutige Identifizierung des jeweiligen cytoplasmatischen Erbmaterials möglich, da der Umweg über biochemische Reaktionen vermieden und direkt das Erbmaterial untersucht wird.

Als weiteres Ergebnis wird die Konstanz des cytoplasmatischen Erbmaterials vor verschiedenem kerngenetischen Hintergrund deutlich: Nach mehr als 40 Jahren Selbstung (J.Schwemmle, 1938) der beiden Formen 1 und 8 mit Oe.berteriana-Mitochondrien bei einmal dem Komplex B·1 und dem Komplex I·v im Kern sind die mt-DNA-Restriktionsfragmente der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme identisch.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zunächst in methodischer Hinsicht mit der mitochondrialen DNA (mt-DNA) aus Gewebekulturen von Oenothera berteriana. Im zweiten Teil wird die mt-DNA verschiedener Bastarde im Hinblick auf die extrachromosomale Konstitution und ihre Konstanz untersucht.

Als Hauptergebnisse sind hervorzuheben:

Ein Verfahren wurde entwickelt, mitochondriale DNA aus Oenothera berteriana zu isolieren und zu reinigen. Der GC-Gehalt der mt-DNA aus Oenothera berteriana wurde aus der Schwebedichte in CsCl (1,710) und Schmelzpunktanalyse ermittelt. Mit 50-51 % ist diese DNA GC-reicher als die bisher untersuchten mt-DNA-Populationen in höheren Pflanzen.

Die elektronenmikroskopische Darstellung zeigte, daß die mt-DNA in Oenothera berteriana aus Molekülen einer Länge von 100 Kilobasen besteht.

Durch Spaltung der mt-DNA mit den Restriktionsenzymen Eco RI, Sma I, Hind III und Eca I wurden DNA-Fragmente erhalten, deren Längen nach Auftrennung auf Agarose-Gelen bestimmt wurden. Die Summe dieser Fragmentlängen ergibt 185-210 Kilobasen.

Eine intramolekuläre Sequenzheterogenität der mt-DNA von Oenothera berteriana wird als Erklärung für diese große Zahl an Fragmenten angesehen.

Radioaktive Endmarkierung der während der Isolierung linearisierten Moleküle zeigen, daß die mt-DNA von Oenothera berteriana in einem bestimmten Bereich bricht. Die markierten Endfragmente lassen sich durch Ribonuklease H-Behandlung abbauen. Diese Bruchstelle fällt also mit der Region des "origin of replication" zusammen. In vivo scheint diese Gegend mit einem Protein verbunden zu sein, das bei unvollständiger Reinigung der mt-DNA im Elektronenmikroskop an der DNA dargestellt wurde.

Ein Vergleich der mit den Restriktionsenzymen Hind III, Eco RI, Sma I und Bam HI erhaltenen Fragmente der mt-DNA aus verschiedenen Oenotheren-Bastarden bestätigte die für diese Pflanzen aus den vorangegangenen Untersuchungen erschlossene Konstitution dieser cytoplasmatischen DNA. Die Identität und Konstanz der mt-DNA aus Oenothera berteriana konnte auch auf einem aus Oe. berteriana und Oe.odorata gemischten Hintergrund nachgewiesen werden. Andererseits zeigten berteriana- und odorata-Mitochondrien, jeweils kombiniert mit den gleichen Komplexen B•1 der Oenothera berteriana, charakteristische Unterschiede.

Literaturverzeichnis

Albring, M., Griffith, J. and Attardi, G. (1977): Association of a Protein Structure of Probable Membrane Derivation with HeLa Cell Mitochondrial DNA near its Origin of Replication. Proc.Natl.Acad.Sci. 74, 1348-1352

Benz, R. (1979): Die Atmungsaktivität isolierter Mitochondrien verschiedener Raimannie Oenotheren. In Vorbereitung

Blair, D.G., Sherratt, D.J., Clewell, D.B., and Helinski, D.R. (1972): Isolation of Supercoiled Colicinogenic Factor $E_1$ DNA Sensitive to Ribonuclease and Alkali. Proc.Natl.Acad.Sci. 69, 2518-2522

Bohnert, H.J. (1977): Size and Structure of Mitochondrial DNA from Physarum polycephalum. Exp.Cell Res. 106, 426-430

Borst, P. and Grivell, L.A. (1978): The Mitochondrial Genome of Yeast. Cell 15, 705-723

Borst, P. and Hoeijmakers, J.H. (1979): Structure and Function of Kinetoplast DNA. J.Supramol.Struct.Suppl. 3, 138

Boseley, P.G-, Tuyns, A. and Birnstiel, M.L. (1978): Mapping of the Xenopus laevis 5.8S rDNA by restriction and DNA sequencing. Nucl.Acids Res. 5, 1121-1137

Brennicke, A. (1979a): Restriction Analysis of mt DNA from Oenothera berteriana. J.Supramol.Struct.Suppl. 3, 141

Brennicke, A. (1979b): Untersuchungen an mitochondrialer DNA aus Oenothera berteriana. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.360 240

Brennicke, A. and Frey, H.D. (1977): Properties of an Adenosine Cyclic Phosphates Degrading Enzyme in Nicotiana tabacum L. var.Xanthi. Z.Naturforsch. 32c, 297-300

Büsen, W. (1976): Zelluläre Ribonuklease H. Dissertation, Tübingen

Christner, J. (1973): Der Einfluß des Plasmotypus auf die Flavonoidsynthese (Untersuchungen an Raimannia Oenotheren). Dissertation, Tübingen

Cleland, R.E. (1972): Oenothera. Academic Press Inc., London

Clayton, D.A., Gillum, A. and Martens, P.A. (1979): Structure and Function of the Two Mitochondrial Replication Origins. J.Supramol.Struct.Suppl. 3, 135

Cummings, D.J., Belcour, L. and Grandchamp, C. (1979a): Mitochondrial DNA from Podospora anserina. Molec.gen.Genet. 171, 229-238

Cummings, D.J., Belcour, L. and Grandchamp, C. (1979b): Mitochondrial DNA from Podospora anserina. Molec.gen.Genet. 171, 239-250

Dietrich, W. (1977): The South American Species of Oenothera Sect.Oenothera (Raimannia, Renneria; Onagraceae). Ann.Missouri Bot.Gard. 64, 425-626

Fonty, G., Crouse, E.J., Stutz, E., and Bernardi, G. (1975): The Mitochondrial Genome of Euglena gracilis. Eur.J.Biochem. 54, 367-372

Frey, H.D. u.Schwemmle, B. (1967): Zur genetischen Analyse der circadianen Rhythmik bei höheren Pflanzen. Nachrichten der Akad.d.Wissenschaften in Göttingen 10, 106-107

Guerry, P., LeBlanc, D.J. and Falkow, S. (1973): General Method for the Isolation of Plasmid DNA. J.Bacteriol. 116, 1064-1066

Hachtel, W. u.Schwemmle, B. (1972): Zur Beteiligung des Plasmons an der Regulation der L-Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL). Z.Pflanzenphysiol. 68, 127-133

Hagemann, R. (1964): Plasmatische Vererbung.
VEB Gustav Fischer Jena

Herrmann, R.G., Bohnert, H.-J., Kowallik, K.V., and Schmitt, J.M. (1975): Size, Confirmation and Purity of Chloroplast DNA of some Higher Plants.
Biochim.Biophys.Acta 378, 305-317

Herrmann, R.G., Bohnert, H.J., Crouse, E.J., Driesel, A.J., Schmitt, J.M., and Gordon, K. (1979): Physical Mapping and Localisation of Genes on Spinacia and Oenothera Chloroplast DNA. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 360, 281

Kolodner, R. and Tewari, K.K. (1972): Physicochemical Characterisation of Mitochondrial DNA from Pea Leaves.
Proc.Natl.Acad.Sci. 69, 1830-1834

Kolodner, R. and Tewari, K.K. (1979): Inverted Repeats an Chloroplast DNA from Higher Plants.
Proc.Natl.Acad.Sci. 76, 41-45

Kroon, A.M., Vos, W.M.de, and Bakker, H. (1978): The Heterogenity of Rat-Liver Mitochondrial DNA.
Biochim.Biophys.Acta 519, 269-273

Levings, C.S.III and Pring, D.R. (1979a): Organisation and Information Content of Mitochondrial DNA's of Higher Plants.
J.of Supramol.Struct.Suppl. 3, 134

Levings, C.S.III and Pring, D.R. (1979b): Mitochondrial DNA of Higher Plants and Genetic Engeneering.
Genetic Engeneering (Vol.1) J.K.Setlow and A.Hollaender, Editors, Plenum Press, New York and London

Marmur, J. and Doty, P. (1962): Determination of the Base composition of DNA from its Thermal Denaturation Temperature.
J.Mol.Biol. 5, 109-118

Nitsch, J. and Nitsch, C. (1969): Haploid Plants from Pollen Grains. Science 163, 85-87

Pring, D.R., Levings, C.S.III, Hu, W.W.L., and Timothy, D.H. (1977): Unique DNA Associated with Mitochondria in the "S"-type Cytoplasm of Male-sterile Maize. Proc.Natl.Acad.Sci. 74, 2904-2908

Quetier, F. and Vedel, F. (1977): Heterogeneous Population of Mitochondrial DNA Molecules in Higher Plants. Nature 268, 365-368

Royer, H.D. and Hollenberg, C.P. (1977): Saccharomyces cerevisiae 2-um DNA. Molec.gen.Genet. 150, 271-284

Schildkraut, C.L., Marmur, J., and Doty, P. (1962): Determination of the Base Composition of DNA from its Buoyant Density in CsCl. J.Mol.Biol. 4, 430-443

Schwemmle, J. (1938): Genetische und zytologische Untersuchungen an Eu-Oenotheren I. Die Analyse der Oenothera berteriana und Oenothera odorata. Z.Vererbungsl. 75, 358-368

Schwemmle, B. (1962): Über den Einfluß von Kern, Plasma und Plastiden auf die photoperiodische Reaktion einiger Raimannia Oenotheren. Planta 58, 619-646

Smith, H.O. and Birnstiel, M.L. (1976): A Simple Method for DNA Restriction Site Mapping. Nucl.Acids Res. 9, 2387-2399

Sparks, R.B. and Helinski, D.R. (1979): Association of Cellular Membrane of E.coli Minicells with the Origin Terminus Region of Replication of Plasmid Col EI DNA. Nature 277, 572-575

Steinemann, M. (1978): Co-replication of Satellite DNA of Chironomus melanotus with Mainband DNA during Polytenization. Chromosoma 66, 127-139

Suyama, Y. and Bonner, W.D. (1965): DNA from Plant Mitochondria. Plant Physiol. 41, 383-388

Synenki, R.M., Levings, C.S.III, and Shah, D.M. (1978): Physicochemical Charakterisation of Mitochondrial DNA from Soybean. Plant Physiol. 61, 460-464

Terpstra, P., Holtrop, M., and Kroon, A. (1977): Heterogeneous Base Distribution in Mitochondrial DNA of Neurospora crassa. Nucl.Acids Res. 4, 129-139

Upholt, W.B. and Dawid, I.B. (1977): Mapping of Mitochondrial DNA of Individual Sheep and Goats: Rapid Evolution in the D Loop Region. Cell 11, 571-583

Wells, R. and Birnstiel, M. (1969): Kinetic Complexity of Chloroplastal DNA and Mitochondrial DNA from Higher Plants. Biochem.J. 112, 777-786

Wells, R. and Ingle, J. (1970): The Constancy of the Buoyant Density of Chloroplast and Mitochondrial DNA's in a Range of Higher Plants. Plant Physiol. 46, 178-179

Whitfield, P.R., Herrmann, R.G., and Bottomley, W. (1978): Mapping of the Ribosomal RNA Genes on Spinach Chloroplast DNA. Nucl.Acids Res. 5, 1741-1751

Wolstenholme, D.R., Goddard, J. and Fauron, C. (1979): Structure and Replication of Mitochondrial DNA from the Genus Drosophila. J.Supramol.Struct.Suppl. 3, 136

Lebenslauf

Am 22. Januar 1953 wurde ich in Werne/Lippe geboren. Von 1959 bis 1963 besuchte ich die Volksschule in Herringen und anschließend das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Hamm/Westfalen, wo ich im Mai 1971 das Abitur bestand.

Ab Oktober 1971 studierte ich an der Universität Tübingen Biologie und Physik. Im Sommer 1972 legte ich die Zwischenprüfung in Biologie ab, im Frühjahr 1973 in Anglistik und im Sommer 1973 in Physik.

Im Mai 1975 bestand ich das Staatsexamen in Biologie.

Die vorliegende Arbeit wurde im Oktober 1976 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. B. Schwemmle am Institut für Biologie I begonnen.

Meine akademischen Lehrer waren:

F.W. Bentrup, H. Bießmann, E. Bünning, K.G. Grell, A. Hager, H. Krüger, H. Metzner, F. Oberwinkler, W. Rüdorff, E.M. Sander, B. Schwemmle, W. Seyffert, D. Varjù, G. Weitzel, U. Weser, H. Zähner, K. Zetsche